原著

エストロゲンレセプター陽性乳癌における 腫瘍組織内アロマターゼ発現の検討

昭和大学第2外科, 亀田総合病院産婦人科*

角 田 ゆう子 神 谷 憲太郎 清 水 幸 子*
柏 瀬 立 尚 井 上 和 幸 沢 田 晃 暢
草 野 満 夫

Immunohistochemical Detection of Aromatase in Breast Cancer with the Presence of Estrogen Receptor

Yuko TSUNODA, Kentaro KAMIYA, Yukiko SHIMIZU*,
Tatsuhisa KASHIWASE, Kazuyuki INOUE, Terumasa SAWADA
and Mitsuo KUSANO

Second Department of Surgery, Showa University School of Medicine

**Department of Obstetrics and Gynecology, Kameda Medical Center*

ホルモン依存性乳癌におけるアロマターゼの役割を検討するために、エストロゲンレセプター陽性乳癌の切除標本46例（閉経前16例，閉経後30例）を対象として，抗アロマターゼ抗体を用いて免疫組織染色を行った。エストロゲンレセプター陽性乳癌のアロマターゼ染色陽性率は，閉経前で50%（8/16），閉経後で67%（20/30）と高く，さらに閉経後症例の腫瘍径でT2がT1より有意に陽性率が高かった（ $p=0.02$ ）。閉経後ではエストロゲンレセプター陽性乳癌の増大におけるアロマターゼの関与が示唆され，アロマターゼ阻害剤は閉経後エストロゲンレセプター陽性乳癌に対して治療効果が期待できると考えられた。

索引用語：乳癌（breast cancer），エストロゲンレセプター（estrogen receptor），アロマターゼ（aromatase）

はじめに

ホルモン依存性乳癌の増殖にエストロゲンが深く関与しているため，抗エストロゲン製剤タモキシフェンを中心とする内分泌療法が乳癌治療の大きな柱の1つとなっている。最近では，アンドロゲンからエストロゲンへの転換酵素であるアロマターゼが注目され，アロマターゼ阻害剤の抗腫瘍効果も報告されている¹⁾²⁾。アロマターゼ阻害剤の抗腫瘍効果の背景として，腫瘍組織内のアロマターゼとエストロゲンレセプター（ER）の存在が重要であると考えられるが，臨床研究における乳癌

組織のアロマターゼの存在とERの存在の関係は一定していない^{3)~5)}。今回，対象をER陽性乳癌に絞ることにより乳癌組織のアロマターゼの存在とその役割が明確になると考えて，抗アロマターゼ抗体を用いた免疫組織染色を行い，閉経前後に分けて検討した。

対象および方法

当科で経験した原発性乳癌のうちER陽性の46症例を対象とした。年齢は31歳～85歳で，閉経前乳癌16例，閉経後乳癌30例である。ERはSRL社に依頼して免疫組織染色法（ER抗体：6 F11，ベン

タナ社) で検討し、癌細胞の核の陽性率が10%以上を陽性とした。

アロマターゼ染色に用いた抗アロマターゼ抗体は米国バッドファロー研究所より供与された抗体 (PAbR-9) である。PAbR-9はヒト正常胎盤より精製された97%以上の純度をもつアロマターゼに対して作製された抗ヒト家兎ポリクローナル抗体である⁶⁾。アロマターゼ染色はパラフィン包埋切片を検体として、PAbR-9をPBSで1:1000に希釈し、ヒストファイン・キット (ニチレイ) を用いてアビチン・ビオチン法で行った。染色陽性のコントロールには、³H-water法⁷⁾でアロマターゼ活性を確認したヒト乳癌細胞株 (MCF-7とSK-BR-3) を用い⁸⁾、陰性コントロールには、PAbR-9の代わりに正常家兎血清を用いた。アロマターゼ染色の判定は、Estebanら⁹⁾の基準に従って、腫瘍全体の腫瘍細胞の中で陽性細胞が15%以上あるものを陽性とした。また同時にHE染色も行った。

統計学的な検討は、閉経の状態に関しては χ^2 test、腫瘍径とリンパ節転移に関してはFisher's exact testを用いた。

結 果

対象としたER陽性乳癌46例中28例 (61%) がアロマターゼ染色陽性であった (Fig. 1)。アロマターゼ染色陽性乳癌は、scirrhousで22例中14例 (64%)、papillotubularで14例中 8 例 (57%) であっ

Fig. 1 Double staining of breast cancer tissue (aromatase and estrogen receptor, $\times 200$). Cancer cell nuclei was stained with estrogen receptor antibody and aromatase was immunohistochemically detected in its cytoplasm.

た。solid-tubular, lobular, mucinous, tubular はそれぞれ 1/3, 1/2, 3/4, 1/1 の症例がアロマターゼ染色陽性だった。

閉経の状態で見ると、閉経前乳癌では16例中 8 例 (50%)、閉経後乳癌では30例中20例 (67%) と、閉経後乳癌でアロマターゼ染色陽性率が高かったが、有意差を示すには至らなかった (Table 1)。つぎに、閉経前乳癌と閉経後乳癌の各々で腫瘍径およびリンパ節転移の有無とアロマターゼ染色との関係を検討した。閉経前乳癌では、アロマターゼ染色陽性率がT 1 で38% (3/8)、T 2 で63% (5/8) と腫瘍径増大に従って高くなる傾向にあったが、有意差を示すには至らなかった。リンパ節転移の有無とアロマターゼ染色陽性率との間には全く相関は認められなかった (Table 2)。閉経後乳癌ではT 1 50% (9/18)、T 2 92% (11/12) とT 1 よりT 2 の方が有意にアロマターゼ染色陽性率が高かった ($p=0.02$)。リンパ節転移の有無とアロマターゼ染色陽性率には関係は認められなかった (Table 3)。

Table 1 Correlation between aromatase staining and menopausal status in estrogen receptor-positive breast carcinomas

Menopausal status	Aromatase staining		P value*
	Positive	Negative	
Premenopausal	8	8	0.43
Postmenopausal	20	10	

* Analysis by χ^2 test

Table 2 Correlation between aromatase staining and tumor characteristics in estrogen receptor-positive breast carcinomas on premenopausal status

	Aromatase positive	Aromatase negative	Total	P value
Tumor size				
T1	3	5	8	0.31
T2	5	3	8	
Lymph node				
0	5	6	11	0.99
+	3	2	5	

* Analysis by Fisher's exact test.

† Metastatic deposits to lymph nodes.

Table 3 Correlation between aromatase staining and tumor characteristics in estrogen receptor-positive breast carcinomas on postmenopausal status

	Aromatase positive	Aromatase negative	Total	P value *
Tumor size				
T1	9	9	18	0.02
T2	11	1	12	
Lymph node †				
0	13	6	19	0.99
+	7	4	11	

* Analysis by Fisher's exact test.

† Metastatic deposits to lymph nodes.

考 察

乳癌組織のアロマターゼは、アロマターゼ活性の測定^{3)~5)}、mRNAの検出¹⁰⁾¹¹⁾、免疫組織染色⁹⁾¹²⁾による検討がある。アロマターゼ活性の測定には適切な検体とアイソトープの使用が必要であり、mRNAの検出にも適切な検体と適切なprimerの選択・PCRの条件を要する。しかし、免疫組織染色は適切な抗体を用いれば、パラフィン包埋ブロックを検体として使用することで多数の症例を対象にすることができ、またアロマターゼの局在も検討できる。Estebanら⁹⁾は、免疫組織染色とPCR法を比較して両者に相関があることを示している。今回、本研究に用いた抗アロマターゼ抗体は、³H-water法にてアロマターゼ活性が認められたヒト乳癌細胞株(MCF-7: 105fmol/mgとSK-BR-3: 3,250fmol/mg)の細胞質を陽性に染めており、特にアロマターゼ活性の高いSK-BR-3細胞の細胞質を濃染した。一方臨床検体では、アロマターゼ染色で濃く染った検体で乳癌組織中のアロマターゼ活性を測定したところ950fmol/mgと高く、また術前後の血清エストロゲン値とテストステロン値を測定した結果、術後に血清エストラディオール値が低下し、テストステロン値が上昇した症例を経験している¹³⁾。このことより乳癌組織中のアロマターゼは、ER陽性乳癌において内分泌環境に影響を及ぼすくらい重要な役割を担っていることが推測され、ER陽性乳癌を対象にした検討はアロマターゼの特性を明らかにすると思われる。

アロマターゼを介するエストロゲン合成は、閉経前では主に卵巣で行われ、閉経後では副腎由来のアンドロゲンが脂肪や血管内皮細胞、そして乳癌組織に存在するアロマターゼによってエストロゲン供給が行われていると考えられている。本研究でも閉経前乳癌より閉経後乳癌でアロマターゼ染色陽性率が高く、またBoluferら⁵⁾も閉経後乳癌でアロマターゼ活性が高い腫瘍の割合が多いことを報告しており、閉経後乳癌組織内でのエストロゲン合成におけるアロマターゼの存在の重要性が示唆された。さらに、腫瘍径との関係で、閉経後乳癌においてT1よりT2の方がアロマターゼ染色陽性率が有意に高かったことより、ER陽性の乳癌では、閉経後の状態においてエストロゲン合成律速酵素であるアロマターゼが腫瘍の増大に関与している可能性が示唆された。

近年、AnastrozoleやLetrozoleなどの新しいアロマターゼ阻害剤の進行性乳癌に対する治療効果が報告され¹⁴⁾¹⁵⁾、アロマターゼ阻害剤の使用が広まってきている。さらにテラーメイドの内分泌治療をめざして、アロマターゼの免疫組織染色を用いれば、個々の乳癌組織のアロマターゼの存在の検討を行うことができると考えられるため、今後、広く臨床使用ができるような抗アロマターゼ抗体の普及が必要と思われた。

結 語

ER陽性乳癌におけるアロマターゼについて免疫組織染色法で検討した。閉経後ER陽性乳癌で腫瘍の増大におけるアロマターゼの関与が示唆され、閉経後乳癌におけるアロマターゼ阻害剤の治療効果予測因子として期待できる。

稿を終えるにあたり、抗アロマターゼ抗体を御提供いただきました米国バッファロー医学財団の大沢由男博士、ならびに病理学的御指導を頂きました当大学第2病理太田秀一教授に深く感謝致します。

References

- 1) Dowsett M: Biological background to aromatase inhibition. *The Breast* 5:196-201, 1996
- 2) de Jong PC, van de Ven J, Nortier HWR, et al:

- Inhibition of breast cancer tissue aromatase activity and estrogen concentrations by the third-generation aromatase inhibitor vorozole. *Cancer Res* 57 : 2109-2111, 1997
- 3) Silva MC, Rowlands MG, Dowsett M, et al : Intratumoral aromatase as a prognostic-factor in human breast carcinoma. *Cancer Res* 49 : 2588-2591, 1989
 - 4) Lipton A, Santen RJ, Santner SJ, et al : Prognostic value of breast cancer aromatase. *Cancer* 70 : 1951-1955, 1992
 - 5) Bolufer P, Ricart E, Lluch A, et al : Aromatase activity and estradiol in human breast cancer : its relationship to estradiol and epidermal growth factor receptors and to tumor-node-metastasis staging. *J Clin Oncol* 10 : 438-446, 1992
 - 6) Yoshida N, Osawa Y : Purification of human placental aromatase cytochrome P-450 with monoclonal antibody and its characterization. *Biochemistry* 30 : 3003-3010, 1991
 - 7) Kitawaki J, Fukuoka M, Yamamoto T, et al : Contribution of aromatase to the deoxyribonucleic acid synthesis of MCF-7 human breast cancer cells and its suppression by aromatase inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 42 : 267-277, 1992
 - 8) Tsunoda Y, Shimizu Y, Tsunoda A, et al : Breast carcinomas with immunocytochemical detection of aromatase in fine-needle aspirates : Report of three cases. *Human Pathol* 32 : 348-351, 2001
 - 9) Esteban JM, Warsi Z, Haniu M, et al : Detection of intratumoral aromatase in breast carcinomas : an immunohistochemical study with clinicopathologic correlation. *Am J Pathol* 140 : 337-343, 1992
 - 10) Lu Q, Nakamura J, Savinov A, et al : Expression of aromatase protein and messenger ribonucleic acid in tumor epithelial cells and evidence of functional significance of locally produced estrogen in human breast cancers. *Endocrinology* 137 : 3061-3068, 1996
 - 11) Kristensen VN, Harada N, Yoshimura N, et al : Genetic variants of CYP 19 (aromatase) and breast cancer risk. *Oncogene* 19 : 1329-1333, 2000
 - 12) Sasano H, Frost AR, Saitoh R, et al : Aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human breast carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 81 : 4042-4046, 1996
 - 13) Tsunoda Y, Shimizu Y, Tsunoda A, et al : Change in serum oestradiol and testosterone concentrations after mastectomy for breast cancer with high aromatase activity. *Eur J Surg* 167 : 234-236, 2001
 - 14) Bonnetterre J, Buzdar A, Nabholz JM, et al : Anastrozole is superior to tamoxifen as first-line therapy in hormone receptor positive advanced breast carcinoma. *Cancer* 92 : 2247-2258, 2001
 - 15) Michaud LB, Jones KL, Buzdar AU : Combination endocrine therapy in the management of breast cancer. *Oncologist* 6 : 538-546, 2001